

**ÄNDERUNGEN DER ZUSAMMENSETZUNG VON
LIPIDEN IN GLATTEN UND RAUHEN
MIKROSOMENMEMBRANEN DURCH BEHANDLUNG
VON KANINCHEN MIT PHENOBARBITAL**

Christa Steubl

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554604_0012

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München

Vorstand: Professor Dr. Manfred K i e s e

ÄNDERUNGEN DER ZUSAMMENSETZUNG VON LIPIDEN
IN GLATTEN UND RAUHEN MIKROSOMENMEMBRANEN
DURCH BEHANDLUNG VON KANINCHEN MIT PHENOBARBITAL

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christa Steubl

aus

Dresden

Jahr

1973

Mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. G. Lange

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Kiese

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6. 11. 1973



Für die freundliche Überlassung des Themas, für seinen wertvollen Rat und seine jederzeit bereitwillig gewährte Unterstützung möchte ich Herrn Professor Dr. G. Lange meinen herzlichen Dank aussprechen.

Die Behandlung von Tieren mit sog. Enzyminduktoren (langwirkende Barbiturate, wie z.B. Phenobarbital, chlorierte Kohlenwasserstoffe, z.B. Chlorphenothan (DDT), polyzyklische Kohlenwasserstoffe, z.B. 3,4-Benzypren und bestimmte anabole Steroide, z.B. Methyltestosteron) bewirkt eine Zunahme von Menge und Aktivität des Arzneimittel-umbauenden Systems im endoplasmatischen Retikulum der Leberzelle. Die zwei Hauptbestandteile dieser Zellfraktion sind sog. "rauhe" Membranen (rough membranes), die Ribosomen tragen, und sog. "glatte" Membranen (smooth membranes) ohne diese Partikel. Die rauhen Membranen sind hauptsächlich der Ort der Proteinsynthese; in ihnen sind die Enzyme, welche körperfremde, lipoidlösliche Stoffe umbauen, nur in geringer Konzentration vorhanden. In den glatten Membranen befinden sich die Arzneimittel-umbauenden Enzyme in sehr viel höherer Konzentration. Während der Enzyminduktion kommt es zu einer Zunahme von mikrosomalen Proteinen und Lipiden, und es findet eine sehr starke Vermehrung des glatten endoplasmatischen Retikulums statt. Protein wie auch Lipidzunahme können sowohl durch eine Steigerung der Synthese wie auch durch eine Hemmung des Abbaus bedingt sein (Übersicht bei CONNEY 1967).

Die Membranen sind aus Strukturproteinen und Lipiden aufgebaut und tragen die Enzyme in gebundener Form, d.h. in einer bestimmten, für die enzymatische Aktivität wichtigen Konformation (SIEKEWITZ 1963). Ob die Lipide nur für die Struktur der Membranen Bedeutung haben oder ob sie auch am enzymatischen Prozeß mitbeteiligt sind, ist nicht genau bekannt. Gesichert ist nur ihre Rolle für die Aufrechterhaltung einer für die enzymatische Aktivität optimalen Struktur (Abstände von Bindungs- und Reaktionszentren? "substrate guiding"?; ZAKIM 1970, ELING and DI AUGUSTINE 1971, SCHULZE and STAUDINGER 1971, MARSHALL and McLEAN 1971). Weiterhin ist die Zusammensetzung der Lipide sicherlich von Bedeutung für die Permeabilität der Membranen, vielleicht auch

für die räumliche Struktur des mikrosomalen Elektronentransportsystems.

Um der Beantwortung der Frage nach der Bedeutung der mikrosomalen Lipide für die im endoplasmatischen Retikulum ablaufenden enzymatischen Reaktionen (meist mischfunktionelle Oxygenierungen) näher zu kommen, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich durch die Behandlung von Tieren (Kaninchen) mit dem Induktor Phenobarbital die Zusammensetzung der Lipide in den rauhen und glatten Membranen des endoplasmatischen Retikulum ändert, da dies die Aktivitäten der neugebildeten Enzyme beeinflussen könnte (vgl. auch qualitative Änderungen während des Induktionsprozesses LANGE 1966, NETTER 1966, SLADEK and MANNERING 1966, ALVARES et al. 1969, GUARINO et al. 1969, KRÖBER et al. 1970, RICKERT and FOUTS 1970).

METHODEN

1. Behandlung der Tiere

Männliche und weibliche Kaninchen einer Mischrasse (Gewicht bei Beginn der Behandlung ca. 1700 g, Ernährung: Altromin K-¹⁾ Standardfutter, Wasser ad libitum) erhielten 21 Tage lang täglich 40 mg Phenobarbital-Natrium/kg s.c.. Kontrolltiere erhielten keine Injektionen. 24 Std. nach der letzten Injektion wurden die Tiere zur Isolierung der Mikrosomen aus der Leber getötet.

2. Isolierung der Lebermikrosomen

Die Tiere wurden durch Nackenschlag und Entbluten aus den eröffneten Carotiden getötet. Aus der sofort entnommenen Leber wurde der Preßsaft nach v. JAGOW et al (1965) gewonnen. Dieser wurde mit 2 Volumina isotoner NaCl-Lösung verdünnt und zur Entfernung von Zellfragmenten, Zellkernen und Mitochondrien 20 min bei +3°C mit 9000 x g zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden die Mikrosomen in der Ultrazentrifuge Spinco, Modell L 2-65 K, als Niederschlag nach 60 min Zentrifugieren bei 78 000 x g erhalten. Dieser Niederschlag wurde zweimal mit der dem Überstand entsprechenden Menge isotoner NaCl-Lösung gewaschen. Der letzte Niederschlag wurde in isotoner NaCl-Lösung suspendiert (aufgefüllt auf 3/5 des Preßsaftvolumens) und bei +3°C aufbewahrt. Diese Suspensionen enthielten Mikrosomen aus 2,2 g Leber/ml.

2.1. Präparation der rauen und glatten Mikrosomen (nach FOUTS 1961)

1 Volumen Leberpreßsaft wurde mit 2 Volumina 0,25 M Sucrose-Lösung verrührt und 20 min bei 9000 x g in der MSE-Zentrifuge High-speed 18, Rotor 8 x 50 ml, zentrifugiert. In Zelluloseröhrchen wurden 3,5 ml 1,31 M Sucroslösung mit 7,5 ml 9000 x g-Überstand überschichtet und in der Spinco-Zentri-

1) Altrogge GmbH, Lage/Lippe

fuge, Modell L 2-65 K, Rotor 40, bei 105 000 x g für 8 Std. zentrifugiert.

Nach dieser Zeit befanden sich die glatten Mikrosomen als weißliche Schicht etwa in der Mitte der Röhrchen, die rauhen Mikrosomen als dunkelbraunes Pellet am Röhrchenboden; die beiden Fraktionen waren getrennt durch eine trübe gelbliche Zwischenzone.

Der Überstand oberhalb der glatten Mikrosomen wurde verworfen, die glatten Mikrosomen wurden in Zellulosebecher für den Rotor 50 abpipettiert, mit Aqua dest. aufgefüllt und bei 95 000 x g für 90 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, der Niederschlag mit entmineralisiertem Wasser abgespült und mit 0,75 ml einer 0,25 M Sucrose-Lösung verrührt. Diese Suspensionen wurden mit isotoner NaCl-Lösung so verdünnt, daß sie glatte Mikrosomen aus 3 g Leber/ml enthielten.

Die trübe gelbliche Zwischenzone wurde abgegossen, der verbleibende Niederschlag (= rauhe Mikrosomen) wurde mit entmineralisiertem Wasser abgespült und dann mit 0,5 ml entmineralisiertem Wasser verrührt. Diese Suspensionen wurden mit isotoner NaCl-Lösung so verdünnt, daß sie rauhe Mikrosomen aus 3 g Leber/ml enthielten.

3. Isolierung und Reinigung der Gesamtlipide

Die Gesamtlipide wurden nach FOLCH et al. (1957) isoliert und gereinigt. Die Mikrosomensuspension wurde in die 20-fache Menge Chloroform-Methanol (2:1, v/v) eingetragen und nach 24-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur durch fettfreies Papier abfiltriert. Das Filtrat wurde mit dem 0,2-fachen Volumen Wasser in einem Meßzylinder geschüttelt und die nach der Trennung in zwei Phasen erhaltene obere Schicht sorgfältig abgesaugt. Die untere Phase mit den gereinigten Lipiden wurde im Rotationsverdampfer (Rotavapor der Fa. Büchi, Flawil/Schweiz) bei Badtemperaturen nicht über 40°C eingedampft und die Inhaltsstoffe über Nacht im Vakuumexsikkator

getrocknet. Nach Bestimmung des Trockengewichts wurden die Gesamtlipide in einem definierten Volumen Chloroform gelöst und in Meßkölchen bei $+3^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

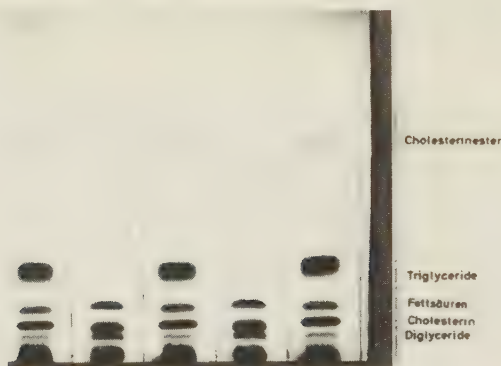
4. Dünnschichtchromatographische Systeme zur Trennung der Mikrosomenlipide

a) Qualitative Bestimmung nichtphosphorhaltiger Mikrosomenlipide nach ZÜLLNER und WOLFRAM (1962)

55 g Kieselgel der Fa. Merck, Darmstadt, wurden in 90 ml H_2O + 15 ml Methanol suspendiert und mit dem Auftragegerät der Fa. Desaga, Heidelberg, als 0,5 mm dicke Schicht auf die Platten (200 x 200 mm) gebracht. Die Platten wurden bei Zimmertemperatur vorgetrocknet, über Nacht im Trockenschrank bei 110°C weiter getrocknet und in einem Behälter mit Blaugel aufbewahrt. Die Chromatographiekammern wurden mit Filterpapier ausgeschlagen und 60 min mit dem Fließmittel gesättigt. Die Substanzen (0,05 ml) wurden in einer Konzentration entsprechend ca 1,5 mg Lipide als 1,0 bis 1,5 cm breites Band mit einer Blutzuckerpipette aufgetragen und mit dem Fließmittelsystem Petroläther-Methyläthylketon-Eisessig (95:4:1, v/v/v) entwickelt. Zur Sichtbarmachung der Fraktionen wurden die Chromatogramme mit 50%iger H_2SO_4 besprüht und im Trockenschrank bei 160°C verascht. Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich mit authentischen Lipidproben¹⁾. In diesem System blieben die Phospholipide am Start. Getrennt wurden Diglyceride, Triglyceride, freies Cholesterin, freie Fettsäuren und Cholesterinester (Abb 1).

1) Die authentischen Proben wurden freundlicherweise von Herrn Dr. D. EBERHAGEN, Medizinische Poliklinik der Universität München, zur Verfügung gestellt.

Abb. 1: Dünnschichtchromatographische Trennung
mikrosomaler Lipide



Methodische Einzelheiten siehe unter Methoden 4 a.

b) Quantitative Bestimmung der Phospholipide nach SKIPSKI
et al. (1964)

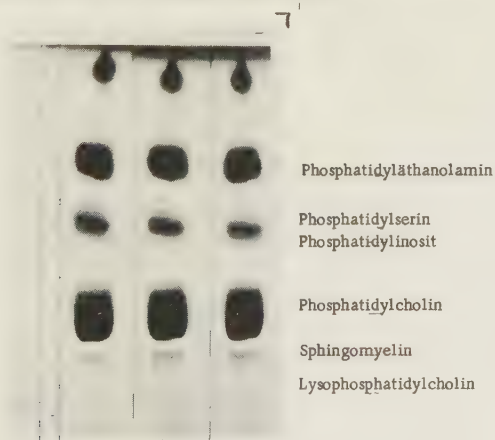
40 g Kieselgel D-0 der Fa. Camag, Muttens/Schweiz, wurden in 90 ml mM Natriumcarbonat-Lösung suspendiert und als 0,5 mm dicke Schicht auf die Platten gebracht. Die Platten wurden über Nacht luftgetrocknet und vor der Chromatographie 60 min bei 110°C aktiviert. Die Chromatographiekammern wurden wie unter Methoden 4a gesättigt. Die Lipidlösungen (0,05 ml) wurden, nachdem die aktivierten Platten auf ca 30 bis 40°C abgekühlt waren, in einer Konzentration entsprechend 35 bis 50 µg Lipidphosphor wie unter Methoden 4a aufgetragen und die Chromatogramme mit dem Fließmittelsystem Chloroform-Methanol-Eisessig (25:15:4:2, v/v/v/v) entwickelt. Die Laufzeit betrug etwa 2 1/2 Std. Die Platten wurden 20 min lang bei Zimmertemperatur getrocknet. Die Fraktionen wurden mit Joddampf sichtbar gemacht und mit einer Nadel zur Kennzeichnung ihrer Lage im Chromatogramm umstochen. Ihre Identi-

fizierung erfolgte durch Vergleich mit authentischen Phosphatidproben¹⁾ und durch Anfärben mit Ninhydrin (BETZING 1965).

In diesem System wurden Lysophosphatidylcholin, Shingomyelin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylinosit, Phosphatidylserin und Phosphatidyläthanolamin getrennt. Ein kleiner Teil der Phospholipide lief mit der Front, wie z.B. Cardiolipin und Phosphatidsäuren.

Nach Abdampfen des Jods wurden die umstochenen Kieselgelbezirke mit Hilfe der von EBERHAGEN u. REMLER angegebenen Absaugvorrichtung in Zentrifugengläser überführt, 2 min lang mit dem Whirlmix der Fa. Censo, Breda/Netherlands, mit 5 ml Methanol homogenisiert, 20 min lang in der Christ-Zentrifuge Modell Junior I bei 6000 U, +3°C zentrifugiert und in aliquoten Teilen des Überstands der Phosphorgehalt nach BARLETT (1959) bestimmt. Die Wiederauffindung betrug $80,5 \pm 0,6 \%$ (standard error, n = 10).

Abb. 2: Dünnschichtchromatographische Trennung
mikrosomaler Phospholipide



Methodische Einzelheiten siehe unter Methoden 4 b.

1) siehe Fußnote Seite 5.

5. Chemische Bestimmungsmethoden

a) Der Proteingehalt der Mikrosomenpräparate wurde nach GORNALL, BARDAWILL a. DAVID (1949, Biuretmethode) bestimmt. Als Eichprotein wurde Rinderserumalbumin (Behringwerke, Marburg a. d. Lahn) benutzt.

b) Die Ribonucleinsäuren (RNS) der rauhen und glatten Mikrosomen wurden nach CERIOTTI (1955) extrahiert und der RNS-Gehalt durch UV-Absorptionsmessung nach OGUR und ROSEN (1950) bestimmt (Aufnahme von Spektren zwischen 210 und 340 nm im registrierenden Spektralphotometer Modell 14 der Fa. Cary, Monrovia/USA).

c) Der Phosphorgehalt der Gesamtlipide und der dünnschichtchromatographisch getrennten Phospholipide wurde nach Veraschung der organischen Substanzen als Phosphorammoniummolybdat nach BARLETT (1959) bestimmt.

d) Der Gehalt der Gesamtlipide an Gesamtcholesterin und freiem Cholesterin wurde nach ZAK (1954) als FeCl_3 -Verbindung bestimmt. Freies Cholesterin wurde vor der Bestimmung als Digitonid gefällt (ZÖLLNER 1965). Gesamtcholesterin - freies Cholesterin = Estercholesterin

6. Errechnung der Zusammensetzung der Gesamtlipide

Die Zusammensetzung der Gesamtlipide aus Phospholipiden, freiem Cholesterin, Cholesterinestern und Neutralfetten wurde aus den durch 5c) und 5d) bestimmten Größen nach EBERHAGEN und ZÖLLNER (1965) errechnet:

Phospholipide: = Menge Lipoidphosphor x 25

Hierbei wurde ein P-Gehalt reiner Phospholipide von 4 % angenommen.

Cholesterinester = Estercholesterin x 1,7

Hierbei wurde ein mittleres Molekulargewicht der an das Cholesterin gebundenen Fettsäuren von 290 (Ölsäure:Arachidonsäure = 1:1) zugrunde gelegt.

Neutralfette:

Gesamtlipid - (Lipoidphosphor x 25 + freies Cholesterin + Estercholesterin x 1,7).

ERGEBNISSE

1. Änderung der Zusammensetzung der Lipide in den gesamten Lebermikrosomen durch die Behandlung von Kaninchen mit Phenobarbital

Während 3-wöchiger Behandlung der Tiere mit Phenobarbital nahm der Gehalt der Mikrosomen an Lipiden stärker zu als ihr Gehalt an Protein (Tabelle 1). Der Proteingehalt stieg aufs Doppelte, der Lipidgehalt aufs Dreifache.

Außer der Menge änderte sich auch die Zusammensetzung der Lipide (Tabelle 2). Die Phospholipide nahmen relativ zu, Cholesterin und Neutralfette relativ ab; der Anteil der Cholesterinester blieb gleich.

Auch die Zusammensetzung der Phospholipoidfraktion änderte sich (Tabelle 3). Der Anteil an Phosphatidylcholin nahm etwas ab. Der Prozentsatz an Phosphatidyläthanolamin blieb gleich. Phosphatidylinosit und Phosphatidylserin nahmen relativ stark zu; ferner nahmen Lysophosphatidylcholin relativ zu, Sphingomyelin relativ ab. Der Anteil der Phospholipide an der Fließmittelfront änderte sich nicht.

Tabelle 1: Änderung des Gehalts von isolierten Leber-
mikrosomen an Protein und Lipiden durch die
Behandlung von Kaninchen mit Phenobarbital

	Kontrolltiere	Behandelte Tiere	Δ in %	p
Protein mg/g Leber	14,2 $\pm$ 0,84	31,9 $\pm$ 1,08	+ 125	<0,001
Lipide mg/g Leber	3,20 $\pm$ 0,18	9,61 $\pm$ 1,27	+ 200	<0,001

Die Zahlen sind Mittelwerte $\pm$ mittlerer Fehler des Mittelwertes aus 9 - 11 Versuchen. p = Irrtumswahrscheinlichkeit für den Unterschied der Werte von unbehandelten und behandelten Tieren.

Behandlung der Tiere: 21 Tage lang täglich 40 mg Phenobarbital-Natrium/kg s.c.

Tabelle 2: Änderung der Lipidzusammensetzung von isolierten
Lebermikrosomen durch die Behandlung von Kanin-
chen mit Phenobarbital

	Werte ¹⁾ von		Δ in %	p
	Kontrolltieren	behandelten Tieren		
PL	74,4 $\pm$ 1,0	82,0 $\pm$ 0,5	+ 11	< 0,001
Ch	4,4 $\pm$ 0,14	2,5 $\pm$ 0,06	- 43	< 0,001
CE	5,3 $\pm$ 0,37	6,0 $\pm$ 0,23		
NF	16,3 $\pm$ 0,94	9,3 $\pm$ 0,29	- 43	< 0,001

PL = Phospholipide, Ch = Cholesterin, CE = Cholesterinester
NF = Neutralfette = Diglyceride, Triglyceride und freie Fettsäuren

- 1) Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der einzelnen Lipide am Gesamtlipid an. Sie sind Mittelwerte $\pm$ mittlerer Fehler des Mittelwerts aus 9 - 11 Versuchen. p = Irrtumswahrscheinlichkeit für den Unterschied der Werte von unbehandelten und behandelten Tieren.
Behandlung der Tiere: 21 Tage täglich 40 mg Phenobarbital-Natrium/kg s.c.

Tabelle 5: Änderung der Zusammensetzung mikrosomaler Phospholipide der Leber durch die Behandlung von Kaninchen mit Phenobarbital

	Werte ¹⁾ von			
	Kontrolltieren	behandelten Tieren	Δ in %	p
LiC	0,4 $\pm$ 0,03	0,6 $\pm$ 0,03	+ 50	< 0,005
SM	2,4 $\pm$ 0,05	1,1 $\pm$ 0,07	- 54	0,001
PC	56,7 $\pm$ 0,66	50,6 $\pm$ 0,78	- 11	< 0,001
PI	6,5 $\pm$ 0,36	11,3 $\pm$ 0,07	+ 81	< 0,001
PS	1,4 $\pm$ 0,04	2,5 $\pm$ 0,07	+ 76	< 0,001
PÄ	31,2 $\pm$ 0,52	31,9 $\pm$ 0,84		
F	1,3 $\pm$ 0,07	1,6 $\pm$ 0,09		

LPC = Lysophosphatidylcholin, SM = Sphingomyelin, PC = Phosphatidylcholin, PI = Phosphatidylinosit, PS = Phosphatidylserin, PÄ = Phosphatidyläthanolamin, F = Phosphatidsäuren, Cardiolipin und andere Phospholipide an der Front.

1) Die Zahlen geben den prozentualen Phosphoranteil der dünnstschichtchromatographisch aufgetrennten Phospholipide an der wiedergefundenen Phosphormenge (= 100 %) an. Sie sind Mittelwerte $\pm$ mittlerer Fehler des Mittelwerts aus je 5 Versuchen. p = Irrtumswahrscheinlichkeit für den Unterschied der Werte von unbehandelten und behandelten Tieren. Behandlung der Tiere: 21 Tage täglich 40 mg Phenobarbital-Natrium/kg s.c.

2. Lipidzusammensetzung in rauhen und glatten Membranen des endoplasmatischen Retikulums der Leber bei unbehandelten und mit Phenobarbital behandelten Kaninchen

Während 3-wöchiger Behandlung der Tiere mit Phenobarbital änderte sich der Gehalt an Protein, Lipiden und RNS in den rauhen Membranen nicht. In den glatten Membranen stieg der Proteingehalt auf über das Doppelte, der Gehalt an Lipiden und RNS auf über das Dreifache an (Tabelle 4).

In beiden Membranen änderte sich die Zusammensetzung der Lipide (Tabelle 5). Die Phospholipide nahmen in rauhen und glatten Membranen relativ etwas zu, Cholesterin relativ ab. Der Anteil der Cholesterinester blieb in den rauhen Membranen gleich, in den glatten Membranen nahm er ab. Der Anteil der Neutralfette nahm in den rauhen Membranen ab, in den glatten Membranen blieb er gleich.

In den glatten Membranen wurde die Zusammensetzung der Phospholipide untersucht. Sie änderte sich durch die Behandlung der Tiere mit Phenobarbital (Tabelle 6). Phosphatidyläthanolamin nahm relativ zu; Lysophosphatidylcholin, Sphingomyelin und die Phospholipide an der Front nahmen relativ ab. Der Anteil an Phosphatidylcholin, Phosphatidyl-inosit und Phosphatidylserin blieb gleich.

Tabelle 4: Zusammensetzung der rauhen und glatten Membranen des endoplasmatischen Retikulums der Leber von unbehandelten und mit Phenobarbital behandelten Kaninchen

Rauhe Membranen		
	Kontrolltiere	Behandelte Tiere
Protein mg/g Leber	7,4 $\pm$ 1,22	6,7 $\pm$ 1,28
Lipide mg/g Leber	0,89 $\pm$ 0,15	1,10 $\pm$ 0,17
RNS mg/g Leber	0,67 $\pm$ 0,06	0,76 $\pm$ 0,11

Glatte Membranen				
	Kontrolltiere	Behandelte Tiere	Δ in %	p
Protein mg/g Leber	6,5 $\pm$ 0,95	15,2 $\pm$ 2,75	+ 134	< 0,02
Lipide mg/g Leber	1,91 $\pm$ 0,38	7,14 $\pm$ 0,85	+ 274	< 0,001
RNS mg/g Leber	0,14 $\pm$ 0,02	0,44 $\pm$ 0,08	+ 214	< 0,005

Die Zahlen sind Mittelwerte $\pm$ mittlerer Fehler des Mittelwerts aus 10 - 11 Versuchen. p = Irrtumswahrscheinlichkeit für den Unterschied der Werte von unbehandelten und behandelten Tieren.

Behandlung der Tiere: 21 Tage täglich 40 mg Phenobarbital-Natrium/kg s.c.

Tabelle 5: Änderung der Lipidzusammensetzung der rauhen und glatten Membranen des endoplasmatischen Retikulums der Leber durch die Behandlung von Kaninchen mit Phenobarbital

Rauhe Membranen				
Werte ¹⁾ von				
	Kontrolltieren	behandelten Tieren	Δ in %	p
PL	77,7 $\pm$ 1,56	82,9 $\pm$ 1,22	+ 6	<0,02
Ch	3,4 $\pm$ 0,25	2,1 $\pm$ 0,10	- 38	<0,001
CE	8,0 $\pm$ 0,41	8,5 $\pm$ 0,39		
NF	10,8 $\pm$ 1,50	6,3 $\pm$ 1,05	- 42	< 0,05

Glatte Membranen				
Werte ¹⁾ von				
	Kontrolltieren	behandelten Tieren	Δ in %	p
PL	82,9 $\pm$ 1,07	88,5 $\pm$ 1,09	+ 7	<0,005
Ch	3,3 $\pm$ 0,18	2,0 $\pm$ 0,09	- 39	<0,001
CE	7,8 $\pm$ 0,75	5,6 $\pm$ 0,35	- 28	<0,02
NF	6,4 $\pm$ 0,95	3,7 $\pm$ 0,83		

PL = Phospholipoide, Ch = Cholesterin, CE = Cholesterinester
 NF = Neutralfette = Diglyceride, Triglyceride und freie Fettsäuren

1) Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der einzelnen Lipide am Gesamtlipid an. Sie sind Mittelwerte + mittlerer Fehler des Mittelwerts aus 10 - 11 Versuchen. p = Irrtumswahrscheinlichkeit für den Unterschied der Werte von unbehandelten und behandelten Tieren.
 Behandlung der Tiere: 21 Tage täglich 40 mg Phenobarbital-Natrium/kg s.c.

Tabelle 6: Änderung der Zusammensetzung von Phospholipoiden der glatten Membranen des endoplasmatischen Retikulums der Leber durch die Behandlung von Kaninchen mit Phenobarbital

	Werte ¹⁾ von			
	Kontrolltieren	behandelten Tieren	Δ in %	p
LEC	4,5 $\pm$ 0,79	1,8 $\pm$ 0,50	- 60	<0,02
SM	5,5 $\pm$ 0,85	1,4 $\pm$ 0,28	- 73	<0,005
PC	51,2 $\pm$ 1,47	51,3 $\pm$ 1,28		
PI+PS	9,8 $\pm$ 0,57	11,4 $\pm$ 0,82		
PÄ	20,8 $\pm$ 1,95	51,4 $\pm$ 1,32	+ 52	<0,001
F	6,5 $\pm$ 0,78	2,2 $\pm$ 0,21	- 65	<0,001

LEC = Lysophosphatidylcholin, SM = Sphingomyelin, PC = Phosphatidylcholin, PI = Phosphatidylinosit, PS = Phosphatidylserin, PÄ = Phosphatidyläthanolamin, F = Phosphatidsäuren, Cardiolipin und andere Phospholipide an der Front.

- 1) Die Zahlen geben den prozentualen Phosphoranteil der dünn-schichtchromatographisch aufgetrennten Phospholipide an der insgesamt wiedergefundenen Phosphormenge (= 100 %) an. Von dieser Gesamtmenge befanden sich 0,5 bis 1,8 % an der Auftragstelle. Die Zahlen sind Mittelwerte $\pm$ mittlerer Fehler des Mittelwerts aus 6 - 8 Versuchen. p = Irrtumswahrscheinlichkeit für den Unterschied der Werte von unbehandelten und behandelten Tieren.
Behandlung der Tiere: 21 Tage täglich 40 mg Phenobarbital-Natrium/kg s.c.

DISKUSSION

Während der Enzyminduktion kommt es zu einer Neubildung von Membranen des endoplasmatischen Retikulums, insbesondere in den Leberzellen (vgl. CONNEY 1967). Die sog. Mikrosomenfraktion der Leberzellen - Bruchteile des endoplasmatischen Retikulums, die durch Differentialzentrifugieren von Leberhomogenat gewonnen werden - wird pro Gewichtseinheit Leber größer und eiweißreicher. Ihre Zusammensetzung kann sich durch die Behandlung von Tieren mit Enzyminduktoren ändern. So fanden REMTNER and MERKER (1965) und LANGE (1968) in Lebermikrosomen von Kaninchen und ORRENIUS et al. (1965) in Lebermikrosomen von Ratten eine stärkere Zunahme des Lipidgehalts als des Proteingehalts nach Behandlung der Tiere mit Phenobarbital. Dieser Befund wurde in der vorliegenden Arbeit bei Verwendung von Kaninchen als Versuchstieren bestätigt. Die relativ stärkere Lipidzunahme war durch eine Neubildung von relativ lipidreicheren und relativ proteinärmeren glatten Membranen bedingt, während Protein- und Lipidgehalt der rauhen Membranen gleich blieben.

Da die Lipide einen wesentlichen Bestandteil der mikrosomalen Membranen darstellen, wurde untersucht, ob sich ihre Zusammensetzung während des Induktionsprozesses ändert. In der nicht in rauhe und glatte Membranen getrennten Mikrosomenfraktion nahmen die Phospholipide relativ zu, während Cholesterin und Neutralfette relativ abnahmen; der relative Gehalt an Cholesterinestern blieb gleich. Ähnliche Änderungen wurden auch in den getrennten rauhen und glatten Membranen gefunden: Während der Behandlung mit Phenobarbital wurde nicht nur in den glatten, sondern auch in den rauhen Membranen der relative Anteil der Phospholipide am Gesamtlipid vermehrt und der relative Anteil an Cholesterin vermindert. GLAUMANN und DALLNER (1968) untersuchten die Zusammensetzung von Lipiden aus Rattenlebermikrosomen

während der Induktion mit Phenobarbital. Diese Autoren trennten die Mikrosomenfraktion in drei Unterfraktionen. Die Unterfraktionen wurden mit einer anderen Methode gewonnen (Dichtegradienten-Zentrifugation unter Zusatz von CsCl oder $MgCl_2$ und mit anderen Zentrifugierungs-Bedingungen als in der vorliegenden Arbeit). Im Gegensatz zu den mit der Methode nach FOUTS (1961) gewonnenen Fraktionen aus Kaninchenleber fanden GLAUMANN und DALLNER (1968) unter ihren Bedingungen in allen drei Unterfraktionen aus Rattenleber keine Änderung im Verhältnis Neutralfette / Phospholipoiden während der Induktion mit Phenobarbital.

Da die Phospholipide der Hauptbestandteil der mikrosomalen Lipide sind, wurde ihre Zusammensetzung in isolierten Mikrosomen unbehandelter und mit Phenobarbital behandelte Tiere untersucht. Die bei unbehandelten Tieren gefundene Zusammensetzung der nicht in rauhe und glatte Membranen getrennten Mikrosomen stimmt mit den Werten anderer Autoren - unabhängig von der Tierart - überein (GLAUMANN and DALLNER 1968, SCHULTE und STAUDINGER 1970, ASSMANN 1971). Sie änderte sich während der Behandlung von Kaninchen mit Phenobarbital: Phosphatidylinosit und Phosphatidylserin nahmen relativ auf fast das Doppelte zu und Sphingomyelin nahm relativ etwa auf die Hälfte ab. Ferner nahm Lysophosphatidylcholin relativ zu, Phosphatidylcholin relativ etwas ab. Dieses Ergebnis stimmt zum Teil mit dem von ASSMANN (1971) gefundenen Werten überein, der ebenfalls eine relative Abnahme von Sphingomyelin fand. ORRENIUS (1965) konnte ebenso wie SCHULZE und STAUDINGER (1970) nach Behandlung von Ratten mit Phenobarbital keine Änderung der Phospholipoid-Zusammensetzung feststellen. Diese Autoren verwendeten jedoch - im Gegensatz zu den Versuchen der vorliegenden Arbeit - Ratten als Versuchstiere und Phenobarbital in einer anderen Dosierung, nämlich 5 Tage lang täglich 100 mg/kg (in dieser Arbeit: 18 Tage lang täglich 40 mg/kg bei Kaninchen). HOLTZMANN und GILETTE

(1968) fanden, daß nach Behandlung von männlichen Raten mit Phenobarbital der Gehalt an Phosphatidyläthanolamin relativ zunahm, während der Gehalt an Phosphatidylcholin relativ abnahm; bei den weiblichen Tieren änderte sich die Zusammensetzung der Phospholipide nicht. Die Autoren führen dies auf eine verlangsamte Umwandlung von Phosphatidyläthanolamin zu Phosphatidylcholin bei den männlichen Tieren zurück.

Von den getrennten Unterfraktionen wurden in dieser Arbeit nur die glatten Membranen hinsichtlich ihrer Phospholipid-Zusammensetzung untersucht. In dieser Fraktion trat während der Induktion mit Phenobarbital eine relative Zunahme von Phosphatidyläthanolamin ein; Lysophosphatidylcholin, Sphingomyelin und die Phospholipide an der Front nahmen relativ etwa auf die Hälfte ab.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit und einigen Arbeiten anderer Autoren (HOLTZMANN and GILETTE 1968 und ASSMANN 1971) bewirkt die Behandlung von Tieren mit Phenobarbital eine Änderung der Zusammensetzung der mikrosomalen Lipide. Die Anwendung von Induktoren in Dosen, welche den Arzneimittelumbau steigern, führt zu einer vermehrten Synthese mikrosomaler Enzyme, die von einer raschen Zunahme der Membranen des endoplasmatischen Retikulums begleitet ist. Die neugebildeten Enzyme benötigen wahrscheinlich auch neue Membranen für ihre Funktion. ORRENIUS et al. (1965) fanden, daß die Einlagerung von P_i^{32} das erste Zeichen des Induktionsvorgangs ist, die meßbar bereits drei Stunden nach der ersten Gabe des Induktors in Erscheinung trat, noch bevor die Enzymaktivitäten sich änderten, d.h. Membranvermehrung und Aktivitätszunahme der Enzyme gingen nicht parallel. Das äußerte sich auch in den Versuchen von ORRENIUS und ERICSSON (1966): Die Enzymaktivitäten kehrten bereits zu einem Zeitpunkt zu ihrem Ausgangswert zurück, an dem die Membranen des endoplasmatischen Retikulums noch stark

vermehrt waren. Auch die in dieser Arbeit gemessenen Änderungen der Lipidzusammensetzung lassen sich nicht mit den an der gleichen Tierart bei Verwendung derselben Dosis des Induktors gemessenen Aktivitätserhöhungen der Enzyme in Parallele setzen (vgl. KRÜBER, LANGE, MATHES, MOR, 1970). SCHULZE und STAUDINGER konnten zeigen, daß die Zunahme von mikrosomalem Phospholipoid und Cytochrom P - 450 während der Behandlung von Ratten mit Phenobarbital gut korreliert war, d.h. daß die Lipidzunahme allein durch die Zunahme des Lipoproteids Cytochrom P - 450 bedingt sein könnte.

Die Zusammenhänge zwischen Membranaufbau und Enzymaktivitäten in den Mikrosomen sind weitgehend noch ungeklärt. Eine Änderung der Zusammensetzung mikrosomaler Lipide und die dadurch verursachte Änderung der Struktur der Membranen des endoplasmatischen Retikulums durch die Behandlung mit einem Induktor (Veränderung der Zahl der Bindungsstellen? - Veränderte Abstände zwischen Bindungs- und Reaktionszentren? - Veränderte Permeabilität ?) könnte zum Teil für die Änderung der Enzymaktivitäten - und zwar sowohl für die quantitativen als auch für die q u a l i t a t i v e n - verantwortlich sein.

ZUSAMMENFASSUNG

1. In der gesamten Mikrosomenfraktion und in den getrennten Fraktionen "rauher" und "glatter" Membranen aus Leber von unbehandelten und 3 Wochen mit Phenobarbital behandelten Kaninchen wurde die Zusammensetzung der Lipide untersucht.
2. In der gesamten Mikrosomenfraktion nahm während der 3-wöchigen Behandlung der Tiere mit Phenobarbital der Proteingehalt auf das Doppelte, der Lipidgehalt auf das Dreifache zu.
3. Innerhalb der Lipide der gesamten Mikrosomenfraktion nahmen die Phospholipide relativ zu, Cholesterin und Neutralfette relativ ab. Der relative Gehalt der Mikrosomen an Cholesterinestern änderte sich nicht.
4. Innerhalb der Phospholipide der gesamten Mikrosomenfraktion nahmen Phosphatidylinosit und Phosphatidylserin relativ auf fast das Doppelte zu; Sphingomyelin nahm relativ um die Hälfte ab. Lysophosphatidylcholin wurde relativ vermehrt, Phosphatidylcholin relativ etwas vermindert. Der Anteil an Phosphatidyläthanolamin blieb unverändert.
5. In den "rauhem" Membranen änderte sich während der 3-wöchigen Behandlung der Tiere mit Phenobarbital der Gehalt an Protein, Lipiden und RNS nicht. Der Anteil der Phospholipide am Gesamtlipid nahm etwas zu; Cholesterin und Neutralfette wurden relativ vermindert. Der Anteil der Cholesterinester änderte sich nicht.
6. In den "glatten" Membranen nahmen - wie in der gesamten Mikrosomenfraktion - der Gehalt an Protein aufs Doppelte und der Gehalt an Lipiden, wie auch der an RNS, aufs Dreibis Vierfache zu. Der Anteil der Phospholipide am Gesamtlipid wurde etwas vermehrt; Cholesterin und Cholesterinester nahmen relativ ab. Der Anteil der Neutralfette blieb gleich.

7. Innerhalb der Phospholipoide der "glatten" Membranen nahmen Lysophosphatidylcholin, Sphingomyelin und die polaren Lipoide, wie z. B. Cardiolipin und Phosphatidsäuren, relativ um mehr als die Hälfte ab; Phosphatidyläthanolamin nahm relativ um die Hälfte zu. Der relative Gehalt an Phosphatidylcholin, Phosphatidylinosit und Phosphatidylserin blieb unverändert.
8. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß während der Induktion der Arzneimittel-umbauenden Enzyme Änderungen in der Zusammensetzung der mikrosomalen Membranen auftreten können, die möglicherweise an den - während des Induktionsprozesses beobachteten - q u a l i t a t i v e n Änderungen mitbeteiligt sind.

LITERATURVERZEICHNIS

ALVARES, A. P., SCHILLING, G., R., KUNTZMAN, R.: Differences in the kinetics of benzpyrene hydroxylation by hepatic drug-metabolizing enzymes from phenobarbital and 3-methylcholantrene-treated rats.

Biochem. biophys. Res. Commun. 30, 588 (1969).

ASSMANN, J.: Änderung der Zusammensetzung mikrosomaler Phospholipide aus Kaninchenleber-Mikrosomen nach Vorbehandlung der Tiere mit Phenobarbital, Chlorphenothan und 3,4-Benzpyren.

Inauguraldissertation München (1972).

BARTLETT, G. R.: Phosphorus assay in column chromatography J. biol Chem. 234, 466 (1959).

BETZING, H., in ZÖLLNER, N., EBERHAGEN, D.: Bestimmung der Lipide im Blut. S. 92.

Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag 1965.

CERIOTTI, G.: Determination of nucleic acids in animal tissues.

J. biol. Chem. 214, 59 (1955).

CONNEY, A., H.: Pharmacological implications of microsomal enzyme induction.

Pharmacol. Rev. 19, 317 (1967).

EBERHAGEN, D., REMLER, E.: Die Lipoidveränderungen in verschiedenen Rattenorganen nach Ganzkörperbestrahlung mit letalen Röntgendosen. IV. Das Verhalten der einzelnen Leberphosphatide.

Strahlentherapie, Sonderdruck.

EBERHAGEN, D., ZÖLLNER, N.: Die Lipoidveränderungen in verschiedenen Rattenorganen nach Ganzkörperbestrahlung mit letalen Röntgendosen. I. Das Verhalten der Lipoide in den Nebennieren.

Z. ges. exp. Med. 138, 581 (1965).

ELING, T. E., DI AUGUSTINE, R. P.: A roll for phospholipids in the binding und metabolism of drugs by hepatic microsomes.

Biochem. J. 123, 539 (1971).

FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, G. H. S.: A sample for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.

J. biol. Chem. 226, 497 (1957).

FOUTS, J.R.: The metabolism of drugs by subfractions of hepatic microsomes.

Biochem. biophys. Res. Commun. 6, 373 (1961).

GLAUMANN, H., DALLNER, G.: Lipid composition and turnover of rough and smooth microsomal membranes in rat liver.

J. Lipid Res. 9, 720 (1968).

GORNALL, A. G., BARDAWILL, C. J., DAVID, M. M.: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction.

J. biol. Chem. 177, 751 (1949).

GUARINO, A.M., GRAM, T. E., GIGON, P. L., GREENE, F. E., GILETTE, J.R.: Changes in Michaelis und spectral constants for aniline in hepatic microsomes from Phenobarbital-treates rats.

Molec. Pharmacol. 5, 131 (1969).

HOLTZMAN, J. L., GILLETTE, J.R.: The effect of phenobarbital on the turnover of microsomal phospholipid in male and female rats.

J. biol. Chem. 243, 3020 (1968).

JAGOW, R. v., KAMPFMEYER, H., KIESE, M.: The preparation of microsomes.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmac. 244, 375 (1963).

KRÖBER, F., LANGE, G., MATHES, S., MOR, G.: Qualitative Änderungen in Lebermikrosomen Phenobarbital-behandelter Kaninchen.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmac. 267, 307 (1970).

LANGE, G.: Über einige Eigenschaften der durch Chlorphenothan oder Phenobarbital induzierten Mikrosomenenzyme aus Kaninchenleber.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmac. exp. Path. 255, 35 (1966).

LANGE, G.: Hydroxylase-Aktivität und Hämoproteingehalt von Mikrosomen aus Kaninchenleber.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmac. exp. Path. 259, 221 (1968).

MARSHALL, W. J., McLEAN, A. E.: A requirement for dietary lipids for induction of cytochrome P-450 by phenobarbital on rat liver microsomal fraction.

Biochem. J. 122, 569 (1971).

NETTER, J. J.: Die oxydative N-Demethylierung von N-Monomethyl-p-Nitranilin.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmac. exp. Path. 255, 151 (1966).

RICKERTS, D. E., FOUTS, J. R.: Benzpyrene pretreatment changes the kinetics and pH optimum for aniline hydroxylation in vitro, but not those for benzphetamine demethylation in vitro by rat liver microsomes.

Biochem. Pharmacol. 19, 381 (1970).

REMMER, H., MERKER, H. J.: Effect of drugs on the formation of smooth endoplasmatic reticulum and drug metabolizing enzymes.

Ann. N. Y. Acad. Sci. 123, 79 (1965).

SCHULZE, H. U., STAUDINGER, HJ.: Änderungen im Gehalt der Phospholipide von Lebermikrosomen unterschiedlich vorbehandelter Ratten und Meerschweinchen.

Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 351, 184 (1970).

SCHULZE, H. U., STAUDINGER, HJ.: Untersuchungen zur Lipoidabhängigkeit der NADH: Semihydroascorbinsäure-Oxidoreduktase (EC 1.6.5.4)

Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 352, 309 (1971).

SIEKEWITZ, P.: Protoplasm: Endoplasmic reticulum and microsomes and their properties.

Ann Rev. Physiol. 25, 15 (1963).

SLADEK, N. E., MANNERING, G. J.: Evidence for a new P-450 hemoprotein in hepatic microsomes from 3-methyl-cholantrene-treated rats.

Biochem. biophys. Res. Commun. 24, 668 (1966).

ZAKIM, D.: Regulation of microsomal enzymes by phospholipids. J. biol. Chem. 245, 4953 (1970).

ZÖLLNER, N., WOLFRAM, G.: Dünnschichtchromatographische Systeme zur Trennung der Plasmalipide.

Klin. Wschr. 40, 1101 (1962)

ZÖLLNER, N., in: ZÖLLNER, N., EBERHAGEN, D.: Bestimmung der Lipide im Blut. S. 284.

Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag 1965.

LEBENS LAUF

Ich, Christa Steubl, wurde am 9. 12. 43 in Dresden als Tochter des Ignaz Steubl und seiner Ehefrau Christiane, geb. Steglich, geboren. Im Jahre 1949 trat ich in die Volksschule St. Nikola in Passau ein, die ich 5 Jahre lang besuchte. Dann ging ich 9 Jahre lang in das Mädchenrealgymnasium Passau Niedernburg, wo ich im Juli 1963 das Abitur machte. Im WS 1963/64 immatrikulierte ich an der Universität München, wo ich im Dezember 1969 die Ärztliche Prüfung bestand. Nach einjähriger Medizinalassistentenzeit erhielt ich im Januar 1971 die Approbation als Arzt. Ich arbeite seitdem als Assistenzärztin auf der Anästhesieabteilung des Kreis- und Stadtkrankenhauses Freising.

